



DEUTSCHES
PATENTAMT

21 Aktenzeichen: P 41 27 570.5
22 Anmeldetag: 21. 8. 91
43 Offenlegungstag: 25. 2. 93

DE 41 27 570 A 1

71 Anmelder:

Battelle-Institut e.V., 6000 Frankfurt, DE

74 Vertreter:

Moll, W., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Glawe, U.,
Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., 8000 München; Delfs, K.,
Dipl.-Ing.; Mengdehl, U., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Niebuhr, H., Dipl.-Phys. Dr.phil.habil., 2000
Hamburg; Merkau, B., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte,
8000 München

72 Erfinder:

Maier, Katarina, Dr., 6368 Bad Vilbel, DE; Ehrhardt,
Gudrun, 6203 Hochheim, DE; Frevert, Jürgen, Dr.,
6000 Frankfurt, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur lokalen antibakteriellen Therapie von Wunden

- 57 Ziel der Erfindung ist es, bereits in einer frühen Phase der Verletzung und Wundheilung gezielt allogene Keratinozytenkulturen einzusetzen, um eine Ausbreitung bakterieller Infektionen zu verhindern und eine verbesserte Wundgrundkonditionierung zu erreichen. Sobald dann autologe Keratinozytenkulturen zur Verfügung stehen, können diese die allogenen Kulturen ersetzen und ebenfalls als Infektionsprophylaxe oder auch zur endgültigen permanenten Deckung eingesetzt werden. Der frühe Einsatz allogener Kulturen hat zusätzlich zu der keimhemmenden Wirkung den Vorteil, daß sie auch als Wundheilungsstimulus dienen, so daß Wundbereiche, die zu einer spontanen Regeneration fähig sind, sehr schnell reepithelisiert werden.

DE 41 27 570 A 1

Die Erfindung betrifft die Anwendung autologer und allogener humaner Keratinozytenkulturen bei großflächigen sowohl oberflächlich zweitgradigen und tiefen drittgradigen Wunden (z. B. Verbrennungswunden) sowie chronischen Wunden zur Infektionsprophylaxe und Wundgrundkonditionierung in einer frühen Phase der Wundheilung.

Hintergrund

Diese Erfindung steht im Zusammenhang mit der Methode der Transplantation von mehrschichtigen autologen Keratinozytenkulturen zur permanenten Deckung unterschiedlich tiefer Verbrennungswunden, die seit mehreren Jahren mit Erfolg durchgeführt wird (1, 2, 3, 4, 5).

Bei dieser Anwendung und allen damit verbundenen Untersuchungen stand bisher immer der Ersatz des durch die Verletzung zerstörten Epithels im Vordergrund d. h. die Wiederherstellung der Integrität der Hautoberfläche (6, 7, 8, 9).

Dies erfordert bei Verletzungen, bei denen die Haut in ihrer gesamten Dicke (Epidermis und Dermis) zerstört ist, die Anwendung autologer Keratinozytenkulturen, die in einem mindestens 3 Wochen dauernden in vitro Kultivierungsprozeß aus einer Hautbiopsie des verletzten Patienten bereitgestellt werden können. Dies geschieht im allgemeinen durch Kultivierung der Keratinozyten in Anwesenheit postmitotischer Fibroblasten (10, 11). Die konfluenten Kulturen werden dann als mehrschichtiger Zellverband unter Verwendung einer neutralen Protease von der Oberfläche der Gewebekulturschale abgelöst (12).

Während der Zeitspanne zwischen Nekrektomie und endgültiger Deckung müssen die Wunden mit temporären Wundabdeckungen versorgt und konditioniert werden, um ein möglichst optimales Transplantationsbett für die Keratinozytenkulturen zu schaffen.

Aber auch im Fall der autologen Spalthaut (Meshgraft)-Transplantation die heute noch in den meisten Kliniken die Methode der Wahl ist, müssen die großflächigen Wunden oft tage- bis wochenlang temporär versorgt werden, bevor ausreichende Mengen an Eigenhaut zur Transplantation zur Verfügung stehen.

In dieser Phase werden die offenen und auch die temporär gedeckten Wundflächen fast immer von verschiedenen apathogenen und pathogenen Bakterien besiedelt. Diese Kontaminationen sind zum einen eine schlechte Voraussetzung für die Entwicklung eines hochwertigen Granulationsgewebes und damit für eine erfolgreiche Transplantation, zum anderen führen sie im schlimmsten Fall zur Sepsis und zum Tod des Patienten.

Komplikationen durch Infektionen treten allerdings nicht nur bei hochgradigen Verbrennungen auf. Auch bei anderen großflächigen und tiefen Verletzungen und auch bei chronischen Wunden beeinflussen bakterielle Infektionen den Heilungsverlauf negativ, so daß einer wirksamen lokalen antimikrobiellen Therapie ohne Nebenwirkungen große Bedeutung zukommt.

Zusammenfassung der Erfindung

Auch im Fall chronischer, nicht heilender Wunden (z. B. Ulcera crurum) sollen Keratinozytenkulturen als keimhemmende physiologische Wundverbände eingesetzt werden. Hierbei ist der Einsatz allogener und autologer Keratinozyten möglich.

Ein Einsatz der Keratinozytenkulturen für diesen Zweck wird gerechtfertigt durch unsere Entdeckung eines antimikrobiellen Faktors, der von in vitro kultivierten, humanen Keratinozyten und Hautfibroblasten, nicht aber von anderen Säugetierzelltypen produziert und nach Transplantation in die Wunde abgegeben wird.

Die Substanz oder das Substanzgemisch, das gegenwärtig Gegenstand weiterer Charakterisierungs- und Isolierungsexperimente ist, ist unter anderem gegen folgende grampositiven und gram-negativen Keime inhibitorisch wirksam: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Bacillus subtilis*. Diese Mikroorganismen werden von Keratinozyten in unterschiedlichem Maße gehemmt, wobei die Stärke der Hemmwirkung der Wirkung üblicher Antibiotica in therapeutischen Dosen (Penicillin, Streptomycin, Tetracyclin, Gentamycin) ähnlich ist.

Bisher wurde in der Literatur lediglich der gegenteilige Effekt, nämlich die hemmende und zerstörende Wirkung von Bakterien bzw. Bakterienprodukten auf Keratinozyten beschrieben (13). Dieser Effekt spielt nach klinischen Erfahrungen vor allem bei sehr stark bakteriell kontaminiertem Wundbett eine Rolle (5), wie es vor allem bei chronischem Granulationsgewebe und schlecht konditionierten Wunden vorliegt. Offensichtlich war bei diesem massiven Befall die antibakterielle Wirkung der vorher nicht getesteten Keratinozyten nicht ausreichend, um die Infektion einzudämmen. In diesen Fällen versucht man, durch topische Anwendung von antimikrobiellen Agentien, die jedoch alle mehr oder weniger zytotoxisch für Keratinozyten sind, die Infektionen zu eliminieren (14). Dabei besteht jedoch immer die Gefahr einer irreversiblen Schädigung der Keratinozyten und generell ein negativer Einfluß auf die Wundheilung sowie die Ausbildung von Antibiotica-Resistenzen. Eine Ausnutzung des antimikrobiellen Effekts der Keratinozyten selbst hingegen ermöglicht eine vollkommen physiologische Infektionsbekämpfung ohne negative Beeinflussung der Wundheilungsvorgänge, aber mit all den positiven Effekten der transplantierten Keratinozytenkultur wie Reepithelisierung, Wundgrundkonditionierung und Schmerzstillung.

Daher ist ein Aspekt unserer Erfindung der gezielte frühzeitige Einsatz allogener Keratinozytenkulturen zur Infektionsprophylaxe bei großflächigen Verletzungen wie z. B. Verbrennungen. Allogene Kulturen, die routinemäßig auf Vorrat kultiviert werden können oder auch aus kryokonservierten Zellsuspensionen binnen einiger Tage herangezchtet werden können, werden auf die chirurgisch präparierten Wunden aufgelegt. Bevorzugt sollen Keratinozytenkulturen angewandt werden, deren antimikrobielle Wirkung zuvor in vitro quantifiziert und

für gut hemmend befunden wurde. Dazu wird folgendes Testsystem eingesetzt:

Die zu testenden Zellkulturen werden abtrypsinisiert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 500 µl Saline (0,9% NaCl Lösung) resuspendiert und die Zellen durch Frieren und Tauen oder vergleichbare Methoden aufgeschlossen. Durch eine weitere Zentrifugation wird der Überstand, der die zytoplasmatische Fraktion der Zellen enthält, von der Membranfraktion getrennt. Der Überstand wird auf eine Proteinkonzentration von 4 mg/ml eingestellt. 100 µl dieser Lösung werden auf ein Zellulose-Testplättchen aufgetragen. Die Testbakterien werden über Nacht in flüssigem CaSo Agar bei 37°C angezüchtet und nach Zellzahlbestimmung mit einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Keimen/Petrischale 10 cm plattiert. Darauf werden die Testplättchen aufgetragen.

Nach 18 h Bebrütung bei 37° kann die inhibitorische Wirkung am Durchmesser des Hemmhofs bestimmt werden. Da auch das Keimspektrum, gegen das die jeweiligen Keratinozyten aktiv sind, ausgetestet werden kann, können die Kulturen auch gezielt gegen bestimmte Keime eingesetzt werden. Die Transplantate können mehrere Tage auf der Wunde verbleiben. Dies erspart dem Patienten die täglichen schmerzhaften und von Blutverlust begleiteten Verbandswechsel, die bei herkömmlichen Verfahren erforderlich sind. Läßt die antimikrobielle Wirkung der Transplantate nach, können sie durch neue Keratinozytenkulturen ersetzt werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung ist die gezielte Anwendung allogener und autologer Keratinozytenkulturen zur Infektionsbekämpfung und Wundgrundkonditionierung bei chronischen nicht heilenden Wunden wie z. B. Ulcera crurum. Chronische Ulcera sind regelmäßig mit apathogenen und pathogenen Mikroorganismen wie z. B. *S. aureus*, *P. aeruginosa*, hämolysierenden Streptococci (Gruppe A und B) etc. besiedelt. Die antibakterielle Wirkung der Keratinozyten kann hier gezielt zum Einsatz gebracht werden, wobei auch autologe Keratinozyten, die aus einer dem Spender zuvor entnommenen Biopsie kultiviert werden, Verwendung finden können. Da Ulcera oft über Jahre hinweg nicht heilen und gegenüber herkömmlichen Methoden therapieresistent sind, spielt hier der Zeitfaktor nicht die entscheidende Rolle wie bei Verbrennungspatienten, so daß hier die zeitliche Verzögerung von 3 Wochen (Zeitraum für die Kultivierung von autologen Keratinozyten) in Kauf genommen werden kann.

Ein weiterer positiver Effekt der Keratinozytentransplantate ist die schmerzstillende Wirkung, die sofort nach Auflegen der Transplantate einsetzt und im allgemeinen bis zu 8 Tagen anhält.

Dieser Effekt und auch die allgemeine positive Entwicklung des Wundgrunds sind vermutlich zurückzuführen auf die physiologische Zusammensetzung und auch auf die Transplantatform und Konsistenz, nämlich die eines mehrschichtigen elastischen zusammenhängenden Sheets, das als physiologische Wundabdeckung ein Wundmilieu schafft, das diese positive Entwicklung ermöglicht. Daher ist diese Form des Transplantats die bevorzugte Anwendungsform. Diese Transplantatform kann durch Anwendung verschiedener bekannter Kultivierungsmethoden erreicht werden (12, 15, 16, 17). Es können aber auch Techniken zum Einsatz kommen, die eine Suspension von Zellen generieren oder bei denen Zellen zu Extrakten verarbeitet werden. Die Zellsuspensionen oder Zellbestandteile können dann entweder direkt oder an geeignete Matrices gebunden, auf Wunden aufgebracht werden.

Anwendungsbeispiele

Bevorzugte Anwendungsbereiche:

Die Anwendung der hier beschriebenen Erfindung ist immer geeignet und sinnvoll bei der Behandlung leicht infizierter, infektionsgefährdeter oder schlecht heilender Wunden, sowie Wunden, die einer Konditionierung bedürfen, wie z. B. Ulcera oder Verbrennungswunden. Da bei verschiedenen Indikationen, in Abhängigkeit von Art, Ausdehnung, bakterieller Besiedelung und Zustand der Wunde jedoch unterschiedliche Anwendungsmöglichkeiten bevorzugt werden, sind im folgenden spezifische Anwendungsbeispiele dargestellt, die jedoch die mögliche Anwendungsbreite der Erfindung nicht limitieren sollen.

Beispiel 1

Bei einem 46-jährigen Patienten mit mehr als 70% meist drittgradigen Verbrennungen der Körperoberfläche wurden nach der Nekrektomie des gesamten linken Beines die Wunden eine Woche lang mit Epigard, einem synthetischen, temporären Hautersatz behandelt. Epigard wurde 1-pro Tag gewechselt, wodurch nach einer Woche ein sauberer, gut granulierter, nekrosefreier Wundgrund entstand. Die bakteriologische Analyse verschiedener Abstriche ergab eine gleichmäßige Besiedelung der Wunde mit *Staphylococcus aureus* und *Enterobacter spec.* Die Wunde wurde dann ohne weitere antiseptische Behandlung mit Keratinozytenkulturen transplantiert, mit sterilen, trockenen Kompressen bedeckt und verbunden. Nach 7 Tagen wurde der Verband und die Cuticerin Gaze, an der die Keratinozyten befestigt waren, entfernt und direkt von der Wundoberfläche Abstriche entnommen. Der mikrobiologische Befund ergab eine deutliche Reduktion des *S. aureus*. *Enterobacter spec.* war nicht mehr nachweisbar. Eine zweite Transplantation mit neuen Keratinozytenkulturen schloß sich ohne weitere Manipulation der Wunde direkt an. Nach vier Tagen wurde die Wundoberfläche erneut durch Abstriche kontrolliert. Die mikrobiologische Analyse ergab keinerlei Kolonien mehr. Die Wunde war steril.

Parallel zur klinischen Anwendung der Keratinozytenkulturen wurden *S. aureus* und *Enterobacter aerogenes* Stämme vom Patienten vor Transplantation isoliert und in vitro untersucht, inwieweit diese Bakterienstämme sensitiv gegenüber den verwendeten Keratinozyten waren. Das Ergebnis zeigte eine deutliche Hemmwirkung der Patientenisolates durch die getesteten Keratinozytenextrakte (Abb. 4). Damit kann die antibakterielle Wirkung der Keratinozyten eindeutig auf einen direkten antimikrobiellen Effekt der Zellen auf die Bakterien zurückgeführt werden.

Beispiel 2

2 Patienten mit venösen Ulcera crurum, die seit mehreren Jahren ohne Erfolg konservativ behandelt worden waren, wurden mit allogenen Keratinozytenkulturen behandelt.

Die Ulcerationen wurden vor der Transplantation regelmäßig gesäubert und antiseptisch behandelt, um ein möglichst optimales Wundbett zu schaffen.

Ein Abklatschpräparat direkt vor Transplantation ergab dennoch eine rasenförmige Besiedelung mit *Pseudomonas aeruginosa* und hämolysierende Streptokokken.

Auf diesen infizierten Wundgrund wurden allogene, an Cuticerin befestigte Keratinozytekulturen transplantiert, d. h. sie wurden aufgelegt, mit sterilen Kompressen abgedeckt und mit leichtem Druck steril verbunden.

Der erste Verbandswechsel und die erste Inspektion der Wunde erfolgte nach 6 Tagen. Die Cuticerin Gaze wurde abgezogen und direkt danach erfolgte ein erneuter Abklatsch der Wunde mit Blutagar. Diesmal war die Kultur steril. Die Keratinozytenkulturen hatten also offensichtlich zur Eliminierung der Infektion geführt. Dies wiederum führte zu einer günstigen Entwicklung des Wundbetts, das nach ungefähr 2 Wochen reepithelisiert war.

Um diesen eindeutigen antimikrobiellen Effekt in vitro nachvollziehen zu können, wurden allogene Keratinozytenkulturen, die parallel mit den Transplantaten angezüchtet worden waren, dann aber nicht für die Klinik benötigt wurden auf verschiedene Bakterienkulturen aufgelegt. Getestete Keime waren: *S. aureus*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa* (s. Abb. 1 und 4).

Eine eindeutige Hemmwirkung, die sich nicht auf den Bereich unter dem Zellkulturepithel beschränkte sondern sich auch auf dem Zellkulturepithel benachbarter Bereiche erstreckte, demonstriert, daß die wirksame Substanz aus dem Sheet in die Umgebung diffundieren kann (Abb. 1). Die Wirkung hält auch bei mehrtägiger Bebrütung an. Somit bestätigen die in vitro Versuche die klinisch beobachteten Ergebnisse vollständig.

Beispiel 3

Nachweis der antimikrobiellen Wirkung in vitro.

Abb. 1 zeigt den antibakteriellen Effekt eines Keratinozytentransplantats in vitro, das in identischer Form klinisch eingesetzt werden kann. Auf der Petrischale wurde *Escherichia coli* mit einer Gesamtkeimzahl von $1 \cdot 10^6$ ausplattiert, anschließend das Transplantat aufgelegt und 18 h bei 37°C bebrütet. Auch bei Bebrütung über mehrere Tage bleibt der Hemmhof bestehen.

Abb. 2 zeigt den antibakteriellen Effekt von Keratinozytenextrakten, die aus den Zellen verschiedener Patienten gewonnen wurden auf einem Zellrasen von *Staphylococcus aureus*. Der Extrakt wurde in einer Konzentration von 0,4 mg Protein pro Testplättchen eingesetzt. Die Hemmwirkung der Zellextrakte ist dosisabhängig, wie in Abb. 3 dargestellt ist.

In Abb. 4 ist das bisher ausgetestete Keimspektrum zu sehen. Verschieden grampositive und gram-negative Bakterienstämme, ein *Staphylococcus aureus* Patientenisolat und ein *Enterobacter aerogenes* Patientenisolat, sowie *Candida albicans* wurden als Testkeime eingesetzt. Im Vergleich zu der antimikrobiellen Wirkung der Keratinozyten, die auch wieder als Extrakte mit einer Konzentration von 0,4 mg Protein getestet wurden (entspricht ca $4 \cdot 10^6$ Zellen), sind noch die Hemmhöfe der Antibiotica Tetracyclin und Streptomycin dargestellt.

Tabelle 1 demonstriert die selektive antibakterielle Wirksamkeit humaner Keratinozyten und Hautfibroblastenkulturen. Extrakte aus einer Vielzahl anderer Zellen unterschiedlichen Spezies- und Organursprungs, sowie spontan transformierte Humankeratinozyten (HaCat) sind nicht wirksam.

Tabelle 1

Effekt verschiedener Zellstämme und -Linien auf Bakterien Zellstämme*)	Spezies Organ		Zelltyp	S. aureus Hemmzone in mm	E. aerogenes Hemmzone in mm
	Spezies	Organ			
NHK Ca2 + reich	Mensch	Haut	epithelial	22	21
NHK Ca2 + arm	Mensch	Haut	epithelial	12	nt
HaCat	Mensch	Haut	epithelial	0	0
Hautfibroblasten	Mensch	Haut	fibroblastoid	16	14
3T3	Maus	Lunge	fibroblastoid	0	0
V79	Chin. Hamster	Lunge	fibroblastoid	0	0
BHK	Syr. Hamster	Niere	fibroblastoid	0	0
MDBK	Rind	Niere	epithelial	0	0
WISH	Mensch	Amnion	epithelial	0	0
K562	Mensch	Blut	hämatoopoetisch	0	0
Tetracyclin 10 µg				29	13
Streptomycin 20 µg				16	21

*) Alle Zellextrakte wurden in einer Konzentration von 0,4 mg Protein eingesetzt.

Patentansprüche

1. Verwendung von kultivierten allogenen oder autologen Keratinozyten oder Hautfibroblasten zur lokalen antibakteriellen Therapie und/oder Infektionsprophylaxe von Wunden.
2. Verfahren zur lokalen antibakteriellen Therapie und/oder Infektionsprophylaxe von Wunden, wobei die Wunden mit allogenen oder autologen Zellkulturepithel abgedeckt werden, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturepithel in vitro aus allogenen oder autologen Keratinozyten kultiviert wird und einen dreidimensionalen Zellverband bildet. 5
3. Verfahren zur lokalen antibakteriellen Therapie und/oder Infektionsprophylaxe von Wunden, wobei Extrakte aus allogenen oder autologen Keratinozyten oder Hautfibroblasten eingesetzt werden.
4. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturepithel zur Therapie und Prophylaxe gegen grampositive und gramnegative Bakterien eingesetzt wird. 10
5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Wunden insbesondere um zweit- und drittgrade Verbrennungswunden sowie schlecht heilende, chronische Wunden handelt (z. B. Ulcera crurum).
6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß kryokonserviertes Zellkulturepithel eingesetzt wird. 15

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

Abb. 1

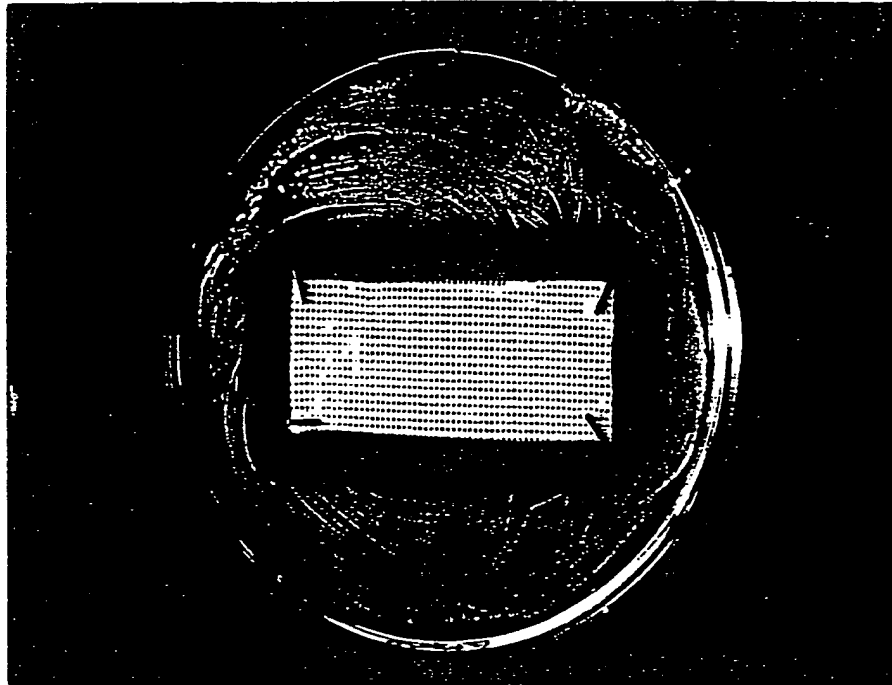


Abb. 2

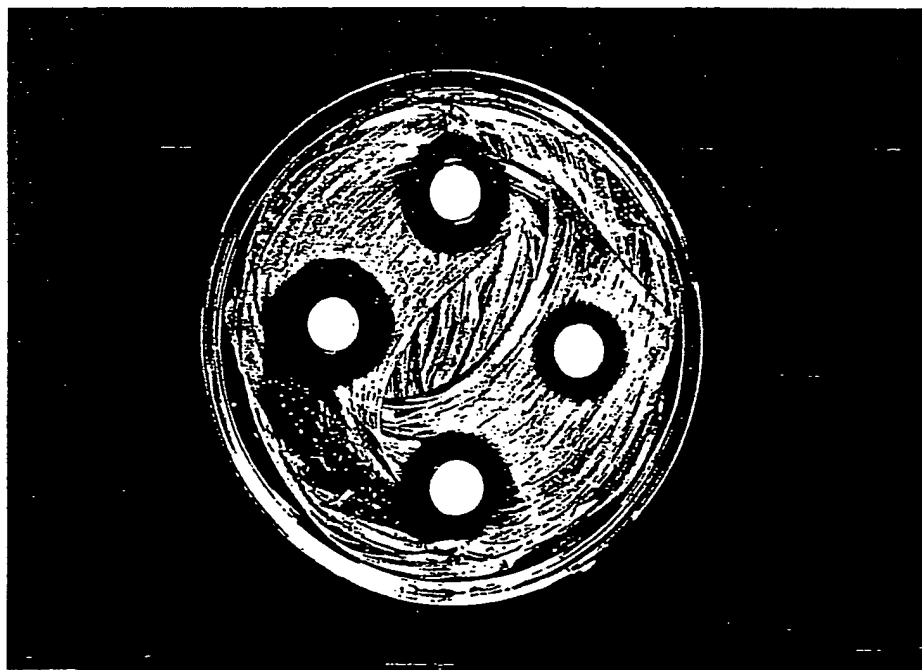


Abb.3 Dosisabhängigkeit
antimikrobielle Wirkung
von Keratinozytenextrakten

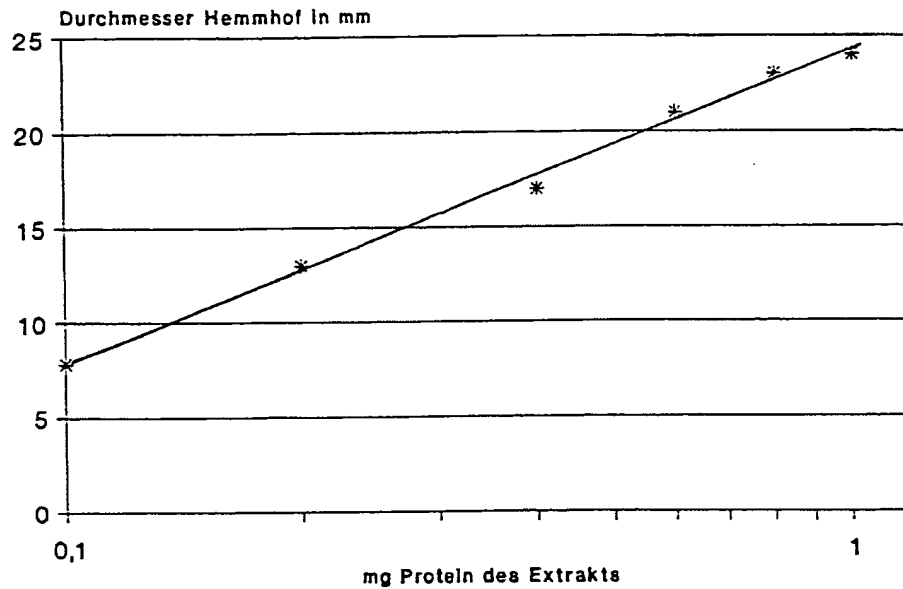
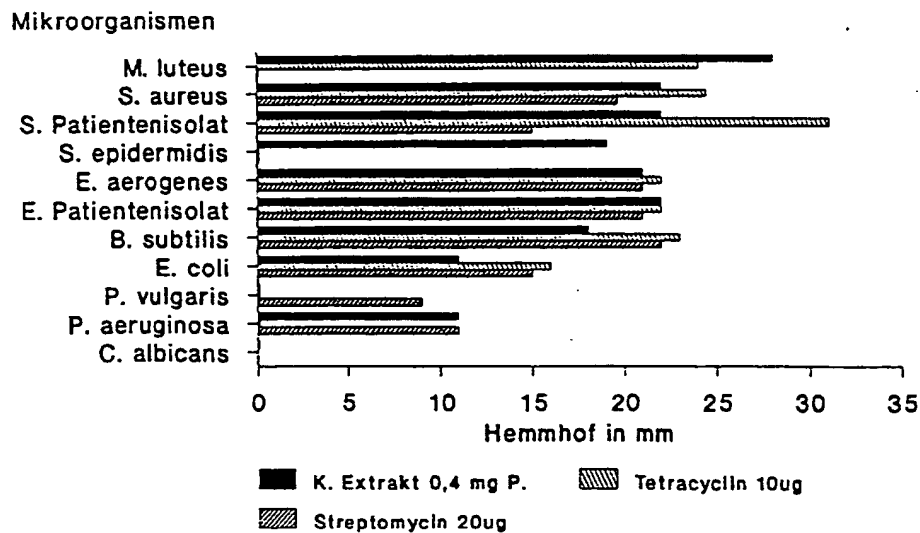


Abb.4 Keimspektrum
antimikrobielle Wirkung
von Keratinozytenkulturen





Europäisches
Patentamt
European Patent
Office
Office européen
des brevets

Description of DE4127570

Print

Copy

Contact Us

Close

Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet@ Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

The invention relates to the use autologer and allogener humaner Keratinozytenkulturen with wide both superficially zweitgradigen and deep drittgradigen wounds (z. B. Burn wounds) as well as chronic wounds to the infection prophylaxis and Wundgrundkonditionierung in an early phase of the Wundheilung.

Background

This invention stands in connection with the method of the transplantation from multilevel auto+lied Keratinozytenkulturen to the permanent covering of differently deep burn wounds, since more years with success is accomplished (1, 2, 3, 4, 5).

With this use and all associated testings the replacement of the epithelium so far destroyed by the injury always stood in the foreground D. h. the re-establishment of the integrity of the skin surface (6, 7, 8, 9).

This requires the Anwendun of autologer Keratinozytenkulturen, which can be made available to at least 3 weeks lasting during vitro cultivation process from a Hautbiopsie of the hurt patient in one with injuries, with which the skin is destroyed in its entire thickness (epidermis and dermis). This is done generally via cultivation of the Keratinozyten in presence of post office-mitotic fibroblasts (1 11). Confluences cultures are then replaced as multilevel cell federation using a neutral protease of the surface of the fabric culture dish (12).

While the time interval between Nekrektomie and final covering the wounds must supplied with temporary Wundabdeckungen and are conditioned, in order to create as optimal a transplant ion bed for the Keratinozytenkulturen as possible.

In addition, in the case of the auto+lied gap skin (Meshgraft) - transplantation today still in most hospitals the method of the choice is, must the wide wounds often conference until lasting for weeks temporarily be supplied, before sufficient quantities of self-skin stand to the transplantation for order.

In this phase the open and also the temporarily covered Wundflächen are nearly always settled by different apathogenen and pathogenen bacteria. These contaminations are for a bad condition for the development of a high-quality granulates ion fabric and thus for a successful transplantation, on the other hand lead them in worst companies to the Sepsis and to

▲ top the death of the patient.

Complications by infections do not however only arise with high-grade combustions. Also with others grossflächig and deep injuries and also with chronic wounds affect bacterial infections the healing process negative, so that great importance is attached to an effective local antimicrobial therapy without side effects.

Summary of the invention

Also in the case more chronically, not sound that wounds (z. B. Ulcera crurum) are to be used Keratinozytenkulturen as germ-restraining physiological wound dressings. Here the inset of allogener and autologer Keratinozyten is possible.

An element of the Keratinozytenkulturen for this purpose is produced justified by our discovery of an antimicrobial factor, which cultivated of in vitro, humanen Keratinozyten and skin fibroblasts, NIC however by other mammal cell types and delivered after transplantation into the wound.

The material or the material composition, that subject-matter of further characterisation and isolation experiments is present is among other things against the following grampositiven and gram negative germ inhibitorisch effective: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Micrococcus luteus, Enterobacter of aero gene, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Bacillus subtilis. These microorganisms are restrained by Keratinozyten in different mass,

whereby the starch of the Hemmwirkung of the effect of usual antibiotics is similar in therapeutic sockets (penicillin, streptomycin, tetracycline, Gentamycin).

So far only the contrary effect became, i.e. the restraining and destructive effect of bacteria and/or in the literature. Bacteria products on Keratinozyten described (13). This effect plays a roller (5) after clinical experiences particularly with very strongly bacterially contaminated Wundbett, as it is present particularly with chronic granulates ion fabric and badly conditioned wounds. Obviously the antibacterial effect of the before not tested Keratinozyten was not sufficient, in order to contain the infection with this solid infestation. Into this felling one, by topische use of antimicrobial Agentien, tries which are more or less cytotoxic however all for Keratinozyten, which infections to eliminate (14). However always the danger of an irreversible damage of the Keratinozyten exists and generally a negative influence the Wundheilung as well as the construction of antibiotic resistances. A utilization of the antimicrobial effect of the Keratinozyten themselves however makes a perfectly physiological infection fight possible without negative influence of the Wundheilungsvorgänge, but with all positive effects of the transplantierten Keratinozytenkultur such as Reepithelisierung, Wundgrundkonditionierung and pain satisfying.

Therefore an aspect of our invention is the purposeful early inset of allogener Keratinozytenkulturen to the infection prophylaxis with wide injuries such as z. B. Combustions. Allogene cultures, which can be cultivated by routine on supply or also from kryokonservierten cell suspensions within some days to be near-bred to be able, become on the surgeon prepared wounds presented. Preferred Keratinozytenkulturen are to be used, whose antimicrobial effect was quantified before in vitro and found good restraining. In addition the following test system is used:

The cell cultures which can be tested are abtrypsiniert and abzentrifugiert. The cell pellet is resuspendiert in 500 μ l saltworks (0.9% NaCl solution) and the cells by freezing and thawing or comparable methods is unlocked. The projection, which contains zytoplasmati the parliamentary group of the cells, is separated by a further Zentrifugation from the diaphragm parliamentary group. The projection is stopped to a protein concentration of 4 mg/ml. 100 μ l of this solution is laid on on a cellulose test panel. The test bacteria are angezüchtet over night in liquid CaSo agar with 37 DEG C and according to cell number regulation with a density of $1.10 < 6 >$ Germs/Petri dish 10 cm clad. Whereupon the test panels are laid on.

According to 18 h Bebrütung with 37 DEG can be determined the inhibitorische effect at the diameter of the restraining yard. Since also the germ spectrum, against which the respective Keratinozyten is active, can be tested, can the cultures also purposeful against certain germs is used. The transplants can remain several days on the wound. This saves the daily painful to the patient and from Blutverlust accompanied federation changes, which are necessary with conventional methods. If the antimicrobial effect of the transplants diminishes, they can be replaced by new Keratinozytenkulturen.

A further aspect of this invention is the purposeful use of allogener and autologer Keratinozytenkulturen to the infection fight and Wundgrundkonditionierung with chronic does not welfare-end wounds such as z. B. Ulcera crurum. Chronic Ulcera is regular with apathogenen and pathogenen microorganisms such as z. B. S. aureus, P. aeruginosa, Streptococcen (group of A and B) hämolysierenden etc. settled. The antibacterial effect of the Keratinozyten can be brought rear purposeful to the inset, whereby also autologe Keratinozyten, which is cultivated before from the donor taken biopsy, can find use. Since Ulcera are therapy resistant often over years not sound and opposite conventional methods, here the time factor does not play the crucial roller as with burn patients, so that the temporal delay can be taken here by 3 weeks (period for the cultivation of auto+lied Keratinozyten) in purchase.

A further positive effect of the Keratinozytentransplantate is the pain-satisfying effect, which begins immediately after presenting the transplants and continues generally up to 8 days.

▲ top This effect and also the general positive development of the Wundgrunds are probably to attribute to the physiological composition and also to the transplant form and consistency, i.e. a multilevel flexible coherent Sheets, which as physiological Wundabdeckung a Wundmilieu creates, which makes this positive development possible. Therefore this form of the transplant is the preferential application form. This transplant form knows incoming goods (12, 15, 16, 17) by use of different well-known cultivation methods reached. In addition, techniques can come to the inset, which generate a suspension of cells or with those cells to excerpts are converted. The cell suspensions or cell components can be bound then either directly or to suitable Matrices, applied on wounds.

Sample applications

Preferred ranges of application:

The use of the invention described here is always suitable and meaningfully with the treatment easily infect, infection-threatened or badly sound that wounds, as well as wounds, which require a Konditionierung, like z. B. Ulcera or burn wounds. Since with different indications, as a function of kind, expansion, bacterial settling and condition of the wound however different application possibilities are preferred, following specific sample applications are represented in, which are not to limit however the possible application width of the invention.

Example 1

With a 46-jährigen patients with more than 70% usually drittgradigen combustions of the body surface were treated according to the Nekrektomie of the entire left leg the wounds one week long with Epigard, a synthetic, temporary skin replacement. Epigard was changed for 1.pro day, whereby after one week a clean, well granular, necrosis-free Wundgrund developed. The bakteriologische analysis of different reductions resulted in an even settling of the wound with *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter spec.* The wound was then transplantiert without further antiseptic treatment with Keratinozytenkulturen, covered and connected with sterile, dry compresses. NAK days was removed the dressing and the Cuticerin gauze, to which the Keratinozyten was fastened, and taken directly from the Wundoberfläche of reductions. The microbiological findings resulted in a clear reducing of the *S. aureus*. *Enterobacter spec.* was not provable any longer. A second transplantation with new Keratinozytenkulturen followed without further manipulation of the wound directly. After four days the Wundoberfläche was controlled again by reductions. The microbiological analysis did not result in any colonies more. The wound was sterile.

To the clinical use of the Keratinozytenkulturen *S. aureus* and *Enterobacter* of aero gene of trunks of the patient before transplantation insulated and in vitro examines, to what extent these bacteria trunks were sensitiv opposite the used Keratinozyten. The result showed a clear Hemmwirkung of the Patientenisolat by the tested Keratinozytenextra (fig. 4). Thus the antibacterial effect of the Keratinozyten can be attributed clearly to a direct antimicrobial effect of the cells to the bacteria.

Example 2

2 patients with venous Ulcera crurum, which had been conservatively treated for several years without success, were treated with allogenen Keratinozytenkulturen.

The joke rations were regularly cleaned before the transplantation and treated antiseptic, in order to create as optimal a Wundbett as possible.

A poor copy preparation directly before transplantation resulted in nevertheless a rasenförmige settling with *Pseudomonas aeruginosa* and hämolysierende Streptokokken.

On this infected Wundgrund allogene, at Cuticerin fastened Keratinozytekulturen, were transplantiert D. h. it wurd presented, with sterile compresses covered and with light pressure sterile connected.

The first federation change and the first inspection of the wound took place after 6 days. The Cuticerin gauze taken off and directly thereafter took place a renewed poor copy of the wound with blood agar. This time the culture was sterile. The Keratinozytenkulturen had led thus obviously to the elimination of the infection. This again led to a favorable development of the Wundbetts, which was reepithelisiert after approximately 2 weeks.

In order to be able to reconstruct this clear antimicrobial effect in vitro, allogene Keratinozytenkulturen, which had been angezüchtet parallel with the transplants, then needed for the hospital was however not presented on different bacterial cultures. Tested germs were *aureus*, *E. aero gene*, *P. aeruginosa* (S. Fig. 1 and 4).

- A clear Hemmwirkung, which was limited not to the range under the cell culture epithelium separates itself also on the cell culture epithelium of neighbouring ranges extended, demonstrates that the effective material from the Sheet can diffuse into the environment (fig. 1). The effect continues also with Bebrütung of several days. Thus into vitro attempts the clinical observed results confirm completely.

Example 3

▲ top

Proof of the antimicrobial effect in vitro.

Fig. 1 shows the antibacterial effect of a Keratinozytentransplantats in vitro, which can be used in identical form clinical. On the Petri dish *Escherichia coli* with a Gesamtkeimzahl of $1.10 < 6 >$ out-clad, afterwards the transplant presented and 18 h with 37 DEG C bebrütet. Also with Bebrütung over several days the restraining yard remains existing.

Fig. 2 shows the antibacterial effect by Keratinozytenextrakten, from the cells of different patients were won on a cell lawn of *Staphylococcus aureus*. The excerpt was used in a concentration by 0,4 mg protein per test panel. The Hemmwirkung of the cell excerpts is dose-dependent, as in fig. 3 is represented.

In fig. 4 that is to be seen so far tested to germ spectrum. Differently grampositive and gram negative bacteria trunks, a *Staphylococcus aureus* Patientenisolat and a *Enterobacter* of aero gene Patientenisolat, as well as *Candida albicans* were used as test germs. Compared with the antimicrobial effect of the Keratinozyten, which were tested also again as excerpts with a concentration of 0,4 mg protein (approx. 4,106 cells), are still the restraining yards of the antibiotics tetracycline and streptomycin correspond represented.

Table 1 demonstrates the selective antibacterial effectiveness of humaner Keratinozyten and skin fibroblast cultures.

Excerpts from a multiplicity of other cells of different species and organ origin, as well as spontaneously transformed Humankeratinozyten (HaCat) are not effective.

Table 1
EMI9.1

▲ top